G. LUCHETTI

SULLA BIOLOGIA DEL " CEPHALOSPORIUM ACREMONIUM CDA ".

RIASSUNTO – L'Autore ha studiato comparativamente la biologia di vari ceppi di *Cephalosporium acremonium* CDA, trovando che questo Fungo presenta una spiccata tendenza al polimorfismo in conseguenza di adattamenti al mezzo di coltura. In particolare ha riscontrato una singolare proprietà di adattamento a dosi elevatissime di boro, in ceppi provenienti da terreni ricchi di boro, proprietà che manca in ceppi della stessa specie, di altra provenienza. In base al pleomorfismo riscontrato nelle esperienze l'Autore riterrebbe opportuna una revisione sistematica del genere.

RÉSUMÉ – L'Auteur a étudié, en comparation, la biologie de certaines souches de *Cephalosporium acremonium* CDA, en concluant que ce champignon présente un tendence très évidente au changement de sa morphologie en conséquence de l'adaptation au moyen de culture. Il a trouvé, particulièrment, une singulière propriété d'adaptation à concentrations très élevées de bore en souches provenantes de sols très riches en bore, propriété qu'on n'a pas trouvée en souches de la même espèce mais d'autre provenance. En conséquence de la variabilité de l'espèce, l'Auteur affirme l'opportunité de la révision systématique du genre.

ZUSAMMENFASSUNG – Der Verfasser hat an verschiedenen Stämmen von *Cephalosporium acremonium* CDA vergleichende biologische Untersuchungen angestellt und gefunden, dass dieser Pilz eine ausgesprochene Tendenz zum Polymorphismus zeigt, die von der Anpassung an die Mittel der Bodenkultur hervorgerufen wird. Besonders in Stämmen aus borreichem Boden hat er eine einzigartige Anpassungsfähigkeit und sehr Borgehalt gefunden, während diese Eigenschaft in Stämmen derselben Gattung, die aus anderen Böden stammen, fehlt. In Anbetracht des erfahrungsmässig festgestellten Polymorphismus hält Verf. es für zweckmässig eine systematische Revision dieser Art herzustellen.

SUMMARY – The Author has found by comparing in his studies, the biology of various clusters of *Cephalosporium acremonium* CDA., that this species of fungus shows a marked tendency to polymorphism due to the fact of its adaptability to any process of cultivation.

He has furthermore discovered singular adaptability and a very notable dose of Boron in clusters grown on soil rich in boron, which property is lacking in clusters of the same species grown on different soil. On the base of pleomorphism verified in the exsperiment, the Author suggest a systematic revision of the said genus.

Da un terreno della zona boracifera di Larderello si ebbe l'occasione di isolare due stipiti di una Mucedinacea, riferibile al gen. *Cephalosporium*, i quali, per le loro caratteristiche micromorfologiche, risultarono appartenere entrambi alla specie *Cephalosporium acremonium* Cda, in base alla diagnosi riportata da Ferraris [3].

I due stipiti si mantengono distinti con i NN. 17 e 20 che si dettero loro all'atto dell'isolamento.

Le ragioni che indussero a studiare parallelamente i due stipiti in parola, insieme ad un ceppo della stessa specie gentilmente fornito dal Laboratorio Crittogamico di Pavia, si renderanno evidenti nel corso del lavoro, ma si basarono specialmente sulla diversa attitudine dei due ceppi a formare coremi.

Si premettono, alla descrizione delle prove sperimentali, alcune notizie riguardanti la specie fungina in esame che ha un comportamento interessante dal punto di vista biologico.

Esistono molte segnalazioni sulla presenza di questa Mucedinacea sui substrati più vari e con diverse attitudini: saprofita, parassita di Funghi, parassita di piante e parassita di insetti. Per molte notizie che si attinsero dal Ferraris [3] si rimanda all'opera di questo A. Altre notizie si hanno dal Dale [2] che lo rinvenne in terra di giardino e da Peyronel [12] che lo isolò dall'aria, Raillo [14] lo isolò dal terreno, Valckeniar-Suringar [18] lo descrive come parassita dell'Olmo, Reddy e Holbert [15], Reddy, Holbert e Erwin [16], Kochler, Dungan e Burlison [4] lo indicano come parassita del Mais e Moesz [10] come parassita di una felce: la *Pteris cretica*.

Infine Zahlbruckner [20] lo ha rinvenuto quale parassita su un *Lecanium* e Zimmermann [21] lo ha rinvenuto su Lecanii i quali vivevano su piante coltivate in serra.

Sulla fisiologia di *Cephalosporium acremonium* Cda non consta che siano stati eseguiti studi accurati come si verifica ad es. per il *Cephalosporium rubescens* Schimon, specie molto affine, se non

identica a quella di cui si riferisce, studiata esaurientemente da Will [19].

Salacz [17] avrebbe constatato, per il *Cephalosporium acremonium*, una notevole resistenza all' arsenico.

* * *

Parte sperimentale.

L' isolamento dei due ceppi di *Cephalosporium* in esame ebbe luogo da colture selezionanti con le quali ci si proponeva di ricercare, nei terreni di Larderello, microrganismi particolarmente resistenti all' azione antisettica del boro (1). Più precisamente, il ceppo n. 17 fu isolato da colture in brodo di fagiuoli al 6 % di borato sodico ed il ceppo 20 da colture sullo stesso substrato, al 4 % di ac. borico.

Le ricerche volsero sopratutto all' indagine delle variazioni macro- e micromorfologiche su colture eseguite con substrati a diversa composizione, sia naturali che artificiali, sia solidi che liquidi.

Il substrato mantenuto come termine di confronto fu sempre l' agar-fagiuoli al 2 % di saccarosio che in questa, come in altre ricerche affini, si è riscontrato uno dei migliori fra gli innumerevoli consigliati ed adottati dai vari Sperimentatori.

Descrizione dei miceti.

Ceppo n. 17. – Colture su agar-fagiuoli.

Micelio settato, ramificato, ialino, granuloso o vacuolato o, talvolta, omogeneo, del diametro di μ 1,5 - 2 (Fig. 1-*A*).

Conidi lungamente ovali od ellittici, continui, ialini, granulosi o

(1) – Per maggiori chiarimenti al riguardo si rimanda a Note precedentemente pubblicate [5-6-7].

bi-tri-pluriguttulati, vacuolati, raramente omogenei (in colture giovani) (Fig. 2-*A*) ancor più raramente con vacuolo polare occupante quasi

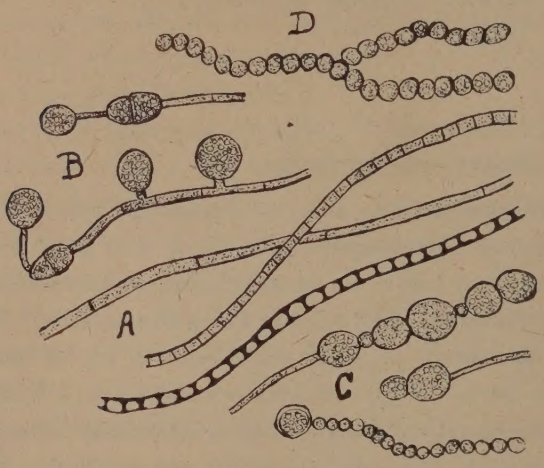

Fig. 1. – *Micelio e clamidospore dei ceppi 17 e 20.*
A – Micelio normale.
B – Clamidospore isolate.
C e *D* – Clamidospore catenulate.

metà del volume, in colture molto vecchie. I conidi misurano μ 3,8 – 5 × 2,5 – 3. Conidiofori eretti, alterni sull' ifa, distaccantisi di norma da questa ad angolo pressochè retto, (Fig. 3, *A* e 4), lunghi μ 20-56, recanti capolini di conidi del diametro di μ 15-26.

I conidi non sono tenuti insieme da sostanze mucillagginose e si distaccano con grande facilità.

Clamidospore presenti o non, a seconda dei substrati di coltura, ialine, talvolta munite di parete spessa od anche di doppia parete, granulose o guttulate, raramente vacuolate, globose, subpiriformi o ellittiche, di μ 5 – 6,8 × 9,2 – 10,5 (Fig. 1, *B* e *C*), apicali o intercalari, isolate, abbinate o catenulate (Fig, 1, *C* e *D*).

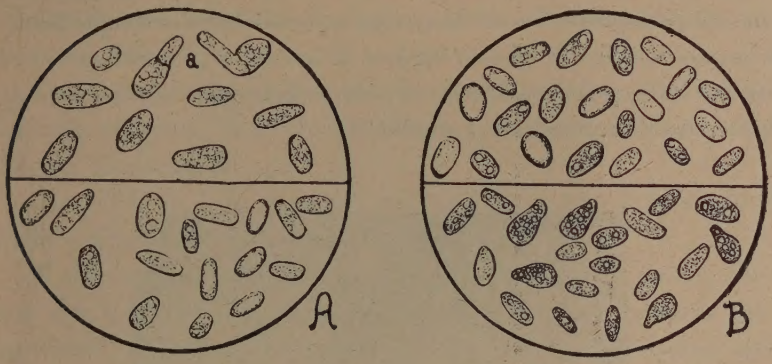

Fig. 2. – *Conidi di Cephalosporium acremonium.*
A – Ceppo 17 } nel semicerchio sup.: su agar fagiuoli;
B – „ 20 } nell'inferiore: su carota.
In *a* conidi in germinazione.

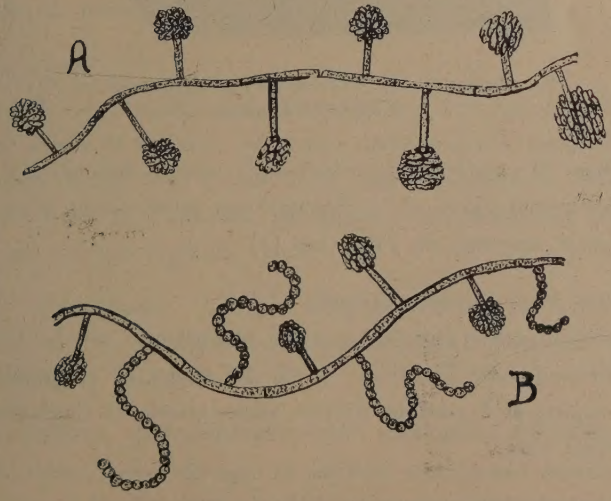

Fig. 3. – *Fruttificazioni conidiche di Cephalosporium acremonium.*
A – Normali.
B – Intercalate con catene di clamidospore.

Su agar-fagiuoli membrana non molto spessa ma coriacea, notevolmente resistente, tanto da potersi asportare talvolta completamente a mezzo dell' ago di platino foggiato ad uncino. Pigmentazione roseo-chiara sulla quale si forma, per invecchiamento, una efflorescenza biancastra di fruttificazioni conidiali.

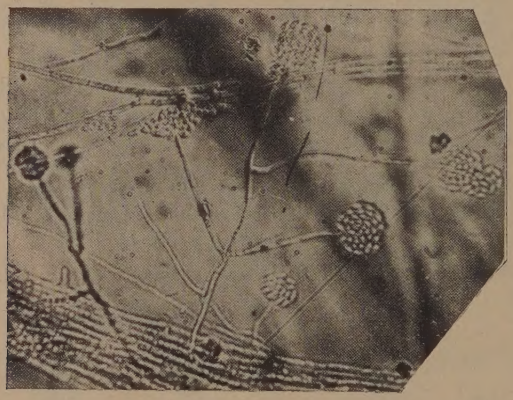

Fig. 4. - *Microfotografia di fruttificazioni conidiche dei ceppi 17 e 20.* (Circa 800 diametri).

In base ai caratteri micromorfologici sopra riportati si è creduto di riferire questo ceppo al *Cephalosporium acremonium* Cda, stando alla diagnosi riportata da Ferraris [3].

Ceppo 20. - Su agar-fagiuoli.

Di questo ceppo non si ripete la descrizione poichè i caratteri sono sostanzialmente identici a quelli del ceppo 17 e, quindi, per le ragioni esposte si è creduto riferire anche questo al *Cephalosporium acremonium* Cda.

Cephalosporium acremonium Cda, ceppo " Pavia ".

Micelio settato, ramificato, ialino, granuloso o vacuolato, del diametro di μ 1,7 - 2,1,

Conidi ovali, piuttosto allungati, talvolta ellittici, guttulati od omogenei, ialini, di μ 3,5 - 5,3 × 2,2 - 3,4.

Conidiofori eretti, alterni, lunghi μ 15 - 45, sorreggenti capolini di conidi del diam. di μ 12 - 24. Conidi non avvolti da muco e facilmente distaccantisi.

Clamidospore, solo su alcuni substrati, di μ 4,5 - 6 × 8 - 10,2 apicali o intercalari, isolate od in catena.

Il riferimento sistematico dei *Cephalosporium*, in genere, presenta non lievi difficoltà in quanto, sfogliando i lavori comparsi sull'argomento, si trovano più specie descritte sotto nomi diversi, pur non apparendo sostanzialmente diversi i Miceti, almeno dalle diagnosi riportate dai vari Autori. Comunque non è possibile giudicare senza avere sott'occhio i ceppi cui le descrizioni si riferiscono. È però dubbio che le classificazioni tentate, anche recentemente, da alcuni studiosi [1 e 13] siano senz'altro da accettarsi essendo tutte basate sullo studio di pochissime specie.

Agar - malto.

Ceppo 17. – Sviluppo non abbondante in una colonia circolare intorno al punto di inoculo. Al centro della colonia formazione di sottili coremi lunghi fino a mm. 6 - 8, abbondantemente fruttificati. Colorazione rosea ben marcata, più che su altri substrati. Micelio e conidi come su agar fagiuoli.

Ceppi 20 e Pavia. – Come il ceppo precedente, ma senza formazione di coremi e con pigmentazione ancora più accentuata. Micelio e conidi come su agar-fagiuoli.

Agar peptone. Agar pepto-glucosato. Agar gluco-peptosato.

Tutti e tre i ceppi su agar al peptone sviluppano scarsamente; non fruttificano il ceppo 17 ed il 20, produce scarse fruttificazioni il ceppo Pavia e formano invece abbondantissime clamidospore (Fig. 1 *B* e *C*) abbondantemente guttulate e talvolta settate.

Gelatina.

Ceppo 17. – Sviluppo lento in superficie ed inizio di fluidificazione al 30° giorno di coltura a 18° - 20° C.

Ceppo 20. – Sviluppo molto più rapido del ceppo precedente ed inizio di fluidificazione al 13° giorno.

Ceppo Pavia. – Sviluppo rapido ed inizio di fluidificazione al 10° giorno.

COLTURE SU CAROTA.

Avendo avuto occasione, durante lo studio dei ceppi isolati dai terreni di Larderello, di coltivare i due stipiti su carota, si potè osservare che uno dei due ceppi aveva spiccata proprietà di formare coremi; precisamente il ceppo 17. L' altro, invece, aveva questa proprietà solo in grado minimo come dimostra la fotografia di Fig. 5.

Fig, 5. – *Colture su carota con formazione di coremi.*
a destra: ceppo 20
a sinistra: „ 17
(grandezza naturale).

Questo indusse ad uno studio comparativo sulla biologia dei due stipiti ed al confronto fra questi e quello di Pavia, con una serie di

esperienze che si passa a descrivere, basate sulle caratteristiche di sviluppo e micromorfologiche su diversi substrati, liquidi o solidi, naturati o artificiali.

Ceppo 17. – Sviluppo rapido di micelio abbondante che ricopre in breve tutto il substrato formandovi anche fitti e numerosi coremi (Fig. 5) di lunghezza variabile da mm. 2 a mm. 5 circa. La Fig. 6 mostra la conformazione esteriore dei coremi mentre la Fig. 7, ad ingrandimento maggiore, mette in evidenza la compattezza della loro struttura.

Micelio normale, ove si eccettui la proprietà di anastomizzarsi; conidi di dimensioni notevolmente maggiori che sugli agar, di μ 2,7-4 × 5-10, ialini, continui, subcilindrici ad estremi arrotondati oppure globosi, granulosi o biguttulati o vacuolati (Fig. 2, *B*).

Fig. 6. – *Microfotografia dei coremi del ceppo 17.* (Circa 85 diam.).

Fig. 7. – *Microfotografia dei coremi del ceppo 17.* (Circa 360 diam.).

Ceppo 20. – Sviluppo meno rapido del ceppo precedente, senza, oppure con rarissime formazioni di coremi, micelio normale, conidi di dimensioni maggiori che sugli agar (μ 2,7 - 4.5 × 5 - 8,2); i conidi più grossi sono piriformi, anzichè subcilindrici od ellittici, ed hanno nell' interno numerosissime guttule.

Ceppo "Pavia". – Non formazione di coremi, micelio normale, conidi di forma normale, ma di dimensioni un poco maggiori che su altri substrati (μ 2,7 - 3,9 × 4 - 8,1).

Colture su patata.

Sullo sviluppo dei diversi ceppi su patata in pezzi si eseguirono varie esperienze. Un primo fatto osservato fu quello relativo alla mancata formazione di pigmento in tutte le successive colture su questo substrato. Inoltre nessun ceppo si dimostrò capace di dar luogo a formazione di coremi; neppure il ceppo 17 che li produce, invece, su carota e su vari agar; il fenomeno è ben visibile in Fig. 8.

Non si ripetono le caratteristiche micromorfologiche dei Miceti in esame in quanto non si constatarono differenze degne di nota da quelle osservate e descritte su agar-fagiuoli. Si nota solo che, su patata a fettine, si ha scarsa fruttificazione, limitata ad una ristretta fascia marginale della colonia, ben visibile nella Fig. 8, sotto forma di efflorescenza biancastra.

Constatata la mancata formazione di pigmento e di coremi su patata, si volle osservare se questi caratteri si ripristinassero, sullo stesso substrato, variando le condizioni di illuminazione delle colture. Si eseguirono, perciò, numerose colture dei vari ceppi su blocchetti di patata in tubi di Roux.

Una serie di tali colture fu esposta a luce diffusa intensa, vicino ad una finestra, altre più lontane dalla sorgente luminosa ed altre, infine, alla semioscurità ed al buio completo; tutti i tubi furono mantenuti alla temperatura ambiente di 17° - 18° C.

In nessuna delle colture si notò formazione di pigmento e di coremi anche dopo 40 giorni dall'inoculazione.

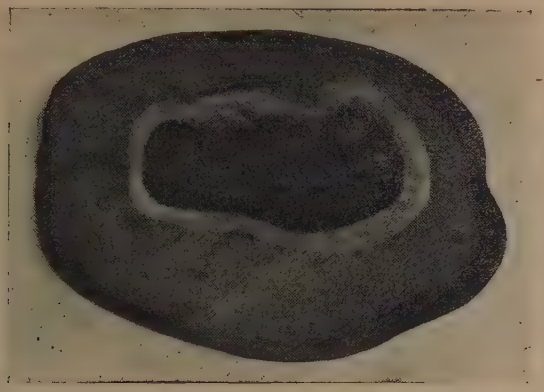

Fig. 8. – *Coltura su fettine di patata.* (gr. nat.).

Nessuna variazione micromorfologica fu notata, infine, fra le colture suddette, mentre si potè constatare che l'entità e la rapidità dello sviluppo erano in proporzione inversa della intensità luminosa a cui le colture stesse erano state sottoposte.

Se ne deduce, quindi, che, nelle condizioni di esperienza sopra riferite, la luce non ha altro effetto che quello di ritardare ed ostacolare, ma non impedire, lo sviluppo dei ceppi in esame.

Ulteriori indagini furono eseguite sulle relazioni fra formazione di pigmento e coremi e substrato nutritivo. Di queste si passa a riferire.

Colture su pappa di riso (1).

Nessuna differenza fu dato di riscontrare fra i caratteri dei vari ceppi coltivati su pappa di riso distribuita in uno strato di circa un

(1) – Questo e tutti gli altri substrati furono preparati secondo le indicazioni di Perotti [11] e distribuiti in capsule Petri del diametro di mm. 180.

centimetro in scatole PETRI. Per brevità, quindi, si riporta una descrizione unica dei caratteri delle colonie, descrizione che vale per i tre ceppi studiati.

Colonia circolare od ellittica, lobata; membrana spessa e compatta (Fig. 9, *C*), con zona centrale secca, vellutata, fruttificata, di color rosa pallido e zona periferica liscia, umida, non fruttificata, biancastra, con piccole zone leggermente pigmentate in rosa pallido.

Micelio di dimensioni normali come pure normali appaiono le spore.

PAPPA DI PANE.

Colonia irregolarmente lobata, costituita da spessa e tenace membrana di color rosa-salmone pallido, leggermente più intenso verso la zona centrale. Superficie liscia, umida, lucente, portante rari coremi nel ceppo 17. L'aspetto della colonia è visibile nella fig. 9, *A*.

Micelio, conidi e clamidospore come su agar-fagiuoli.

Esposte alla luce diffusa le colonie ottenute su questo substrato prendono un colore decisamente più intenso.

L'unica differenza fra i tre ceppi, oltre quella ricordata della formazione di rari ed esili coremi nel ceppo 17, si constatò in una minore fruttificazione di questo stesso ceppo rispetto agli altri due.

PAPPA DI PATATE.

Colonia tondeggiante od ellittica (Fig. 9, *B*) leggermente umbonata verso il centro o, talvolta, con più umboni eccentrici, lobata, con solchi concentrici o, talvolta radiali. Membrana spessa, tenace, compatta, liscia, umida, lucente, poco fruttificata, di color rosa pallidissimo.

Caratteri micromorfologici come su agar-fagiuoli, clamidospore di dimensioni poco inferiori che su altri substrati. Nessuna differenza degna di rilievo fra i tre ceppi.

Liquido di Raulin.

I ceppi 17 e 20 dimostravano uno sviluppo appena apprezzabile dopo 90 giorni dall'inoculazione in liquido di Raulin originale (acido), mentre il ceppo " Pavia " al 30° giorno aveva prodotto piccole colonie

Fig. 9. – *Colonie dei ceppi 17, 20 o " Pavia " su;*
A – pappa di pane
B – „ di riso
C – „ di patate
D – agar-fagiuoli saturo di acido borico e borato di sodio insieme.

sparse, biancastre, sommerse ed una abbondante coperta superficiale, biancastra, con un peso complessivo di materia secca (a 110° C.) di mg. 175,6.

Liquido di Raulin, modificato da Lutz e Guéguen.

Ceppi 17 e 20: scarso sviluppo in profondità, in coloniette sparse, fioccose, biancastre. Micelio di dimensioni maggiori che su substrati solidi, di μ 2,7 - 4,2; conidi assenti. Clamidospore non abbondanti, subpiriformi o piriformi, di μ 6 – 6,8 × 10,2 – 10,5.

Ceppo "Pavia": sviluppo superficiale di coperta biancastra abbondantemente fruttificata, risaliente lungo le pareti del recipiente, del peso secco di mg. 248,7.

Micelio, clamidospore e spore come su agar-fagiuoli.

Liquidi a pH noto.

Si allestirono tre serie di beute da cc. 100 con cc. 50 ciascuna della soluzione seguente:

nitrato potassico	4	solfato di magnesio	0,3
fosfato bipotassico	1	cloruro di sodio	0,1
saccarosio	20	cloruro ferrico	0,01
cloruro di calcio	0,3	acqua di condottura	1000

Ad alcune di esse si aggiunse acido lattico, ad altre carbonato sodico, fino a raggiungere, dopo sterilizzazione in autoclave, i pH seguenti: 3,1 – 3,9 – 5 – 6,1 – 7,1 – 8,2 – 9.

Con ogni ceppo si inoculò una serie di beute e si coltivò in termostato a 24° - 26° per 80 giorni, non essendosi ottenuto, prima di tal termine, uno sviluppo apprezzabile nella maggior parte delle colture dei ceppi 17 e 20. All' 80° giorno si estrassero i corpi fungini che si essiccarono a 110° e si pesarono, non senza aver prima rilevati i caratteri microscopici e macroscopici delle colture stesse.

I risultati ottenuti sono riportati nella tabella I in cui figurano, oltre i pesi assoluti di sostanza secca, in milligrammi, anche i valori relativi al controllo fatto uguale a 100. Come controllo si assunse il valore della coltura in liquido a pH 7,1.

Con i valori percentuali si sono costruiti i grafici della fig. 10, contrassegnati dalla lettera *A*, che indicano la curva di sviluppo dei vari ceppi, in funzione del pH del liquido. Il grafico I, *A* si riferisce al ceppo 17, il II, *A* al ceppo 20 ed il III, *A* al ceppo " Pavia ". Il grafico IV, *A*, infine, è costruito con i valori desunti dalla media dei tre precedenti.

TABELLA I – Sviluppo di *Cephalosporium acremonium* in liquidi a diverso pH (sostanza secca a 110° C.).

pH	Ceppo 17		Ceppo 20		Ceppo " Pavia "		Media
	Peso mg.	% del controllo	Peso mg.	% del controllo	Peso mg.	% del controllo	% del controllo
3,1	0,0	0	0,0	0	73,4 (1)	48	16
3.9	0,0	0	0,0	0	91,7 (1)	66	22
5,0	25,1	45	18,7	23	145,2 (1)	96	54
6.1	68,4 (1)	123	50,1	62	156,1 (1)	103	96
7,1	55,6	100	80,3 (1)	100	151,3 (1)	100	100
8,2	65,5	118	57,8	72	48,3 (1)	32	74
9,0	136,4 (1)	245	52,8	66	20,4	13	108

(1) – coperta superficiale; in tutti gli altri solo sviluppo in profondità.

I rilievi micromorfologici non misero in evidenza differenze notevoli fra le colture dei tre ceppi in liquidi allo stesso pH per cui, per brevità, si riporta una unica descrizione che vale per i tre stipiti.

In pH 3,1 (per il solo ceppo " Pavia "): micelio di μ 1,0 - 1,5 di diam.; conidiofori della lunghezza di μ 32 - 46; capolini del diam. di μ 6,5 - 15,0; conidi di μ 5 - 5,5 × 3 - 3,5; clamidospore assenti.

In pH 3,9 (per il solo ceppo " Pavia "): micelio, conidiofori e co-

nidi come in pH 3,1; presenti clamidospore catenulate, di varia forma, di μ 2,7 – 5 × 5 – 5,7.

In pH 5: micelio c. s.; non fruttificati i ceppi 17 e 20; conidiofori e conidi c. s. per il ceppo Pavia; clamidospore presenti, in discreto numero, delle dimensioni di μ 2,7 – 5 × 5 – 5,7.

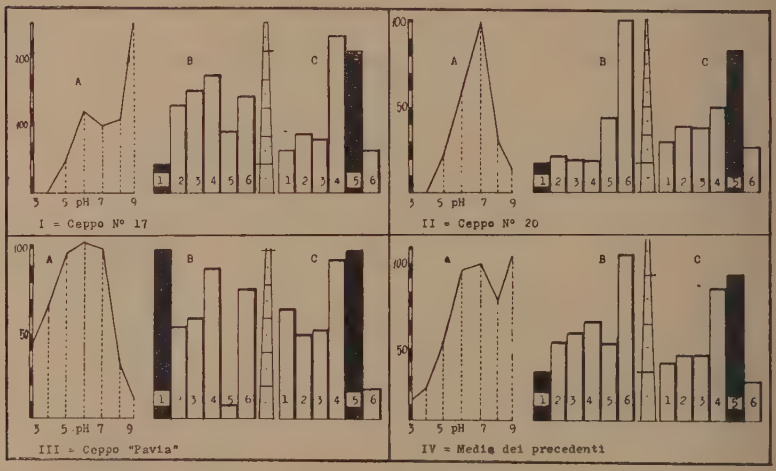

Fig. 10. – *Sviluppo dei vari ceppi in liquidi a diverso pH (grafici A), con diverse sorgenti di carbonio (grafici B) e di azoto (grafici C).*

In pH 6,1: come in pH 5 ma con scarse fruttificazioni conidiali anche nei ceppi 17 e 20.

In pH 7,1: micelio, conidiofori e conidi c. s.; clamidospore abbondantissime (specie nel ceppo Pavia), di μ 5 – 7,5 × 5 – 12,7.

In pH 8,2: fruttificazioni conidiali generalmente molto scarse, con gli stessi caratteri di cui sopra; clamidospore in numero vario, di dimensioni un poco maggiori che in pH 7,1.

In pH 9: nei ceppi 17 e 20 scarsi conidi; micelio di dimensioni normali, clamidospore scarse, delle stesse dimensioni di quelle delle

colture di pH 8,2. Nel ceppo Pavia scarsissimo micelio di μ 1,2 – 2,5; assenti conidi; clamidospore abbondantissime di μ 10 – 15 × 10 – 17,4.

In quest' ultimo ceppo tutto il micelio appare trasformato in clamidospore, isolate, abbinate o catenulate, tanto da far pensare ad una generazione lievitiforme. Le clamidospore di queste colture sono rappresentate dalla microfotografia di Fig. 11.

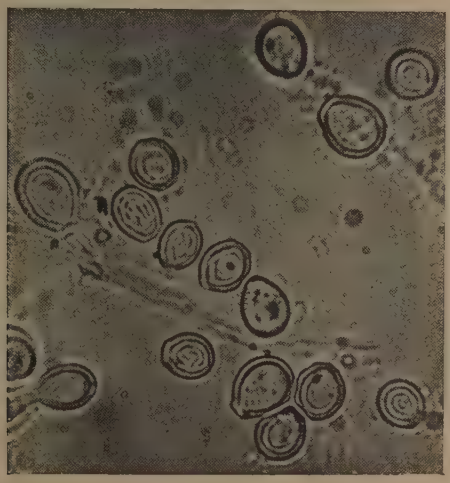

Fig. 11 – *Generazioni saccaromicetiforni in liquidi a pH 9* (ceppo Pavia) (circa 1300 diametri)

Essendo apparso strano il fatto, si pensò di eseguire un trapianto di queste colture su agar-fagiuoli. Dopo pochi giorni si ottenne dal trapianto una coltura macroscopicamente del tutto simile a quelle normali, senonchè all'osservazione microscopica si notò un fatto singolare: ai conidiofori, normali, come normali erano i conidi ed il micelio, erano intercalate catenelle di clamidospore con andamento

sinuoso simili alle fruttificazioni conidiali dei Miceti del genere *Oospora*, come sono rappresentate in Fig. 3, B. e nella microfotografia della Fig. 12.

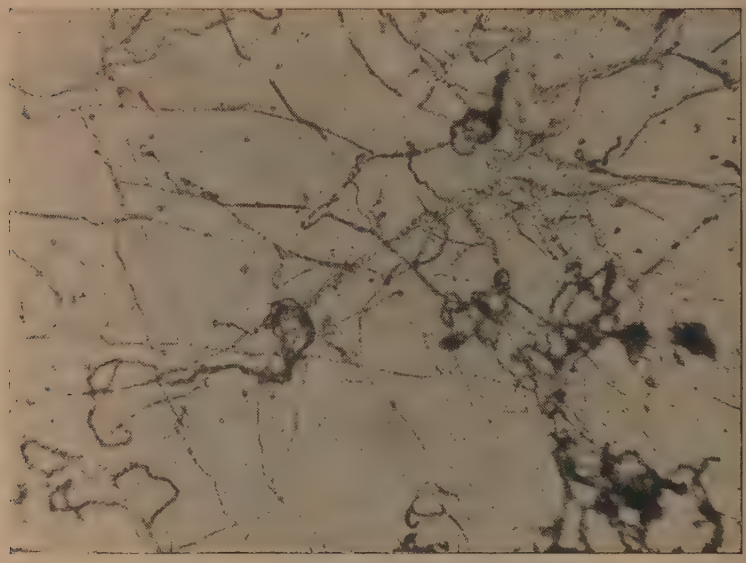

Fig. 12. – *Microfotografia della parte alta di uno striscio (in tubo inclinato di agar-fagiuoli), con formazioni conidiche di Cephalosporium miste a formazioni clamidosporiche catenulate.* (circa 200 diametri).

Detta microfotografia non presenta la chiarezza che sarebbe stata desiderabile, per il fatto che fu eseguita in condizioni particolamente difficili, cioè, su una coltura in tubo. Comunque dalla microfotografia e dal disegno si possono rilevare con una certa evidenza sia i capolini di conidi di *Cephalosporium*, tipici, sia le formazioni clamidosporiche catenulate. Questo carattere non si osservò mai in numerose colture del ceppo " Pavia „, nè degli altri ceppi, provenienti per tra-

pianto diretto dalle colture originariamente avute dal Laboratorio Crittogamico nè dai trapianti successivi mentre è divenuto un carattere normale nel *Cephalosporium* ottenuto dopo il passaggio in coltura liquida a pH 9. La fissità del carattere stesso è stata accertata attraverso sei generazioni successive.

A questo punto è da osservare l'analogia che si riscontra fra il fenomeno sopra detto e quello osservato in un'altra Mucedinacea che si è recentemente descritta [9] nella quale comparivano, fin dall'isolamento, forme conidiche di *Oospora* intercalate ad altre di *Cephalosporium* e che, per tale carattere, si denominò *Oospora cephalosporioides*. Mentre, però, in quest'ultima i caratteri dei conidi erano identici nelle due forme di fruttificazione, nel Micete in esame si hanno forme conidiche tipiche delle fruttificazioni del tipo *Cephalosporium* mentre in quelle di *Oospora* i conidi sono sostituiti da clamidospore.

Altre esperienze furono condotte sul metabolismo dei tre ceppi di *Cephalosporium acremonium* Cda, per quel che riguarda le diverse assimilazioni delle sorgenti di carbonio e di azoto. Una prima serie di esperienze fu allestita con la stessa soluzione nutritiva usata per i liquidi a diverso pH sostituendo al saccarosio altre sorgenti di carbonio, una seconda sostituendovi, invece, il nitrato potassico con altre sorgenti di azoto, sempre, come è naturale, in quantità equimolecolari rispetto ai due elementi. Per brevità si riporta il peso di sostanza secca (in mg.) nella Tabella II e nei grafici di Fig. 10 nella quale le parti indicate con la lettera B si riferiscono alla assimilazione delle sorgenti di carbonio e quelle contrassegnate con C alla assimilazione delle sorgenti di azoto. I numeri che figurano entro i rettangoli, nei due diagrammi, corrispondono a quelli che si trovano accanto ai diversi composti nella Tabella.

I dati relativi al ceppo " Pavia „ si riferiscono allo sviluppo al 18° giorno di coltura; quelli relativi ai ceppi 17 e 20, invece, al 90° giorno.

Tabella II – Sviluppo di *Cephalosporium acremonium* Cda in soluzioni con diverse sorgenti di carbonio e di azoto.

	Sorgente	Ceppo 17		Ceppo 20		Ceppo " Pavia „		Media
		Peso mg.	% del controllo	Peso mg.	% del controllo	Peso mg.	% del controllo	% del controllo
Assimilazione carbonio	1 – glucosio (controllo)	15,5	100	16,2	100	288,0	100	100
	2 – galattosio	48,2	311	20,3	125	160,0	55	164
	3 – saccarosio	56,4	364	18,4	114	171,4	60	179
	4 – lattosio	65,2	421	17,2	106	256,0	90	206
	5 – glicerina	33,4	215	42,3	261	23,0	8	161
	6 – mannite	52,7	340	97,7	603	224,0	78	340
Assimilazione azoto	1 – peptone	17,7	30	24,8	36	156,1	65	40
	2 – asparagina	24,6	42	31,2	46	121,0	51	46
	3 – urea	22,3	38	30,8	45	128,4	54	46
	4 – solfato NH_4	65,2	111	40,3	60	225,0	95	89
	5 – nitrato K (controllo)	58,7	100	68,0	100	238,6	100	100
	6 – nitrito K	17,0	30	21,1	31	42,2	18	26

In tutte le prove eseguite in mezzi liquidi si notò che, mentre il ceppo " Pavia „ sviluppa benissimo in questi substrati, gli altri due non sviluppano che a stento, tanto da non aversi sviluppo apprezzabile talvolta fino al 70° giorno di coltura. I dati che vi si riferiscono sono quindi alquanto incerti poichè alcune lievi differenze possono derivare da maggiore o minore ritardo nell'inizio dello sviluppo.

Maggiore importanza rivestivano le prove, di cui si passa a riferire, riguardanti la boro-tolleranza dei ceppi in esame. Allo scopo si allestirono alcune serie di substrati all'agar-fagiuoli addizionati di quantità crescenti di boro sotto forma di borato sodico o di acido borico e vi si coltivarono i Funghi in parola. I substrati così preparati furono sterilizzati per un'ora al giorno e per tre giorni consecutivi in

vapore fluente a 100° C., anzichè in autoclave, per evitare temperature troppo elevate.

Sgombriamo subito il campo del ceppo " Pavia „ il quale in una prova preliminare non si dimostrò capace di sviluppo in mezzi, sia liquidi che solidi, contenenti l' 1 % di acido borico e l' 1,5 % di borato sodico pari allo 0,18 % di boro.

Agar-fagiuoli con aggiunta di boro.

Le esperienze furono condotte con agar-fagiuoli al 3 %, al 4 % e saturo di acido borico (7,5 %) e di borato sodico (10 %) e infine su agar saturato contemporaneamente di acido borico e di borato sodico contenente il 12,5 % del primo ed il 10 % del secondo. A questo proposito è da notare che mentre la saturazione dell' agar si ha con il 7,5 % di H_3BO_3 e con il 10 % di $Na_2B_4O_7$, se si satura prima il mezzo con borato (10 %) si può riuscire a sciogliere ancora nello stesso agar il 12,5 % di acido borico, cioè, quasi il doppio della quantità che si scioglierebbe da sola. Le ragioni di questo comportamento anomalo dei due composti debbono essere in relazione, oltrechè a reazioni fra i due soluti, anche alla natura del solvente, ricco di sostanze capaci di dare composti organo-borici.

I caratteri macroscopici delle colture su agar-boricati non differiscono da quelli sugli altri agar ove si eccettui la mancata formazione di coremi per il ceppo 17 che spesso, invece, ne forma su agar-fagiuoli semplice.

Nella Fig. 13 si vede una colonia di questo fungo (molto simile a quelle ottenute con il ceppo 20), sviluppata su agar fagiuoli al 4 % di acido borico, in strato di circa mm. 1, in una capsula Petri del diametro di mm. 180.

La colonia, costituita da micelio in parte normale, in parte di dimensioni maggiori del normale, potendo raggiungere il diametro di

μ 3 – 3,5, al 15° giorno non era fruttificata nè vi si potè osservare presenza di clamidospore.

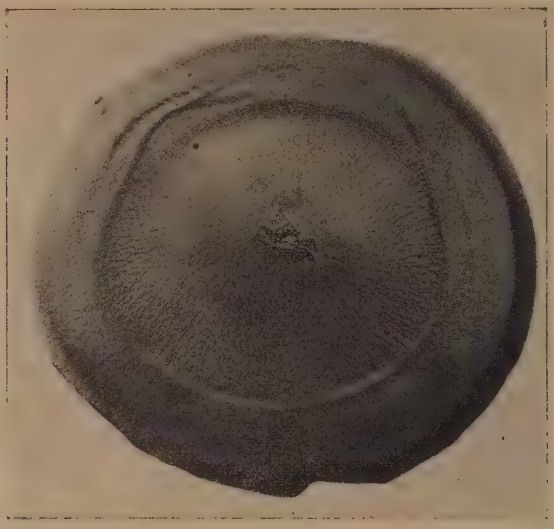

Fig. 13 – *Colonia (ceppo 20) su agar-fagiuoli al 4 % di* H_3 *B* O_3.
(circa grandezza naturale)

Su agar-fagiuoli saturo contemporaneamente di acido borico e borace si ha al 15° giorno, una colonia, del diametro di mm. 50 circa, (Fig. 9, D) bianco-grigiastra, molto ben visibile, sebbene di scarso spessore, sul substrato il quale assume con la saturazione un color bruno-nero.

Membrana compatta, alquanto tenace, abbondantemente fruttificata. Micelio talora grosso potendo raggiungere i μ 2,5; conidi di μ 2 – 2,5 × 5 – 8,5. Assenti vere e proprie clamidospore; se ne notano solo abbozzi in catene.

Gli stessi caratteri macro- e micromorfologici hanno le colonie su agar-fagiuoli saturo rispettivamente di acido borico e di borato sodico.

Brodo di fagiuoli con aggiunta di boro

Con le colture in liquidi addizionati di acido borico e borato sodico si sperimentarono le stesse concentrazioni che con l'agar.

Non si riportano per brevità i caratteri delle singole colture in quanto sono tutti perfettamente normali, salvo una diversa proporzione numerica fra clamidospore e conidi; più numerose le prime nelle concentrazioni maggiori, specie nel ceppo 20. Lo sviluppo, naturalmente, rallenta oltre una certa concentrazione ma non è affatto impedito.

È da notare a questo riguardo che il limite di concentrazione in boro fu imposto in queste ricerche non dall'arresto di sviluppo del Fungo ma dalla solubilità dell'elemento. Molto probabilmente questi due stipiti di *Cephalosporium* avrebbero resistito anche all'azione di concentrazioni molto più elevate.

Notevole, infine, la resistenza di questo Micete alle elevate concentrazioni di sodio (1,2% di Na nel substrato al 10% di borato sodico) ed in genere alle soluzioni concentrate di sali minerali.

Per quanto riguarda l'alimentazione di questo *Cephalosporium* fu dato di notare, durante le ricerche suesposte, che esso, di norma, sviluppa benissimo su brodo di fagiuoli mentre dimostra di tollerare poco bene le soluzioni minerali anche addizionate di saccarosio insieme a composti azotati organici (peptone, asparagina, urea) o minerali (nitrato e nitrito di potassio, solfato ammonico).

Sulla bibliografia riguardante la resistenza dei funghi al boro ci si è soffermati a lungo in altra Memoria [8] a cui si rimanda per le notizie del caso limitandosi qui ad osservare che fino ad ora non erano stati segnalati Miceti resistenti a concentrazioni maggiori del 4% di acido borico.

Conclusioni

Dalle esperienze di cui si è riferito si deduce, anzitutto, come il Fungo in esame, e forse tutti quelli appartenenti allo stesso Genere, abbia una spiccata tendenza alla variabilità dei caratteri macro e micromorfologici.

Sarebbe quindi opportuno, volendo procedere ad un accurata revisione del Gen. *Cephalosporium*, di prendere in esame il maggior numero possibile di specie e, per ciacuna, eseguire una indagine molto minuziosa delle variazioni che si possono riscontrare sui substrati più vari ed in diverse condizioni ambientali, onde accertarsi che caratteri eventualmente riscontrati su alcune specie non derivino, come nel caso descritto del ceppo " Pavia „, da una causa contingente di cui, il più delle volte, potrebbe non esser possibile rintracciare le origini. Donde distinzioni di specie le quali non avrebbero nessun fondamento sistematico.

Un'altra osservazione che scaturisce dalle esperienze sopra riferite è quella relativa al trofismo di questi Funghi più precisamente allo sviluppo in mezzi a diverso pH ed alla assimilazione del carbonio. Mentre, infatti, il ceppo 17 ha il suo ottimo di sviluppo in mezzi decisamente alcalini (pH 9), il ceppo 20 preferisce invece mezzi neutri (pH 7,1), e quello " Pavia „ mezzi leggermente acidi (pH 5,1 — 7,1).

Inoltre il ceppo " Pavia „ assimila meglio di ogni altra sorgente di carbonio il glucosio, quindi il lattosio e la mannite mentre per i ceppi 18 e 20 il glucosio è la fonte di carbonio meno adatta. Questo potrebbe dipendere dal fatto che, mentre il ceppo " Pavia „ è da molti anni coltivato su substrati artificiali, gli altri due all' epoca in cui fu eseguito lo studio erano stati isolati piuttosto recentemente dal terreno.

Resterebbe, infine, da illustrare la eccezionale resistenza al boro dei ceppi 17 e 20 se di questa non si conoscessero già le origini nel materiale stesso da cui si isolarono i ceppi (il terreno della zona bo-

racifera di Larderello), soggetto, nei periodi di siccità ad una concentrazione notevole di boro nella soluzione circolante. Il fatto rientra quindi nei fenomeni di adattamento di cui esso è un esempio degno di nota perchè spinto fino al limite massimo di tolleranza di un elemento tossico.

Pisa, Facoltà di Agraria della R. Università
Istituto di Patologia Vegetale e Microbiologia agraria e tecnica.

(Presentata il 1° Dicembre 1938 - XVII)

Bibliografia

1 - Ciferri R. — *Cephalosporium pseudofermentum n. sp. isolato dalla bocca dell'uomo.* Arch. f. Protist., **78**, *227*, 1932.

2 - Dale E. — *On the Fungi of the soil. II. Fungi from chalky soil, uncultivated mountain peat, and the " blak earth „ of the reclaimed fenland.* Ann. mycol. **12**, *33*, 1914.

3 - Ferraris T. — *Flora italica cryptogama. Pars I.* Rocca S. Casciano, 1910

4 - Kochler B, Dungan G. and Burlison W. L. — *Matury of seed Corn in relation to yelding ability and disease infection.* Journ. Am. Soc. Agr. **26**, *262*, 1934.

5 - Luchetti G. — *A' propos des particulières propriétés borophiles d'un "Cephalosporium „.* Boll. Soc. Int. Micr. 1937.

6 - „ — *Ricerche microbiologiche sui terreni boraciferi di Larderello. (Nota preliminare).* Proc. Verb. Soc. Tosc. Sc. Nat., **46**, 1937.

7 - „ — *Ricerche sulla zona boracifera di Larderello. I - Il boro nel terreno e nelle piante.* Boll. Fac. Agr. R. Univ. Pisa, **13**. 1938.

8 - „ — *Ricerche sulla zona boracifera di Larderello. II - Il boro ed i microrganismi.* Ibidem, **13**, 1938.

9 - Luchetti G. e Favilli R. — *Su di un deperimento di " Phyllocactus hybridus Hort. „ da cause ambientali e sulla biologia di alcuni Funghi da questo isolati.* Ibidem.

10 - Moesz G. — *Mycologiai közlemeniec. IV* - Bot. kozlem., **19**, *44*, 1921.

11 - Perotti R. — *Tecnica di Biologia Vegetale applicata all'Agricoltura.* Roma, 1928.

12 - Peyronel B. — *I germi atmosferici dei funghi con micelio.* Padova, 1909.

13 - Pinkerton M. E. — *A comparative study of conidial formation in Cephalosporium and some related Hyphomycetes.* Doct. Dissert., Washington University, 1936.

14 - Raillo A. — *Beiträge zur Kenntnis der Boden-Pilze.* Ctrlbl. f. Bakt., II. Abt., **78**, *515*, 1929.

15 - Reddy C. S. and Holbert J. R. — *The blak-bundle disease of Corn.* Journ. Agric. Res., **27**, *177*, 1924.

16 - Reddy C. S., Holbert S. R. and Erwin A. T. — *Seed treatment for sweet-corn disease.* Ibidem, **33**, *769*, 1926.

17 - Salacz L. — *Adatok a gombàk argénoldatok banvalò viselkedesehez.* Bot. Kozlem., **12**, *93*, 1913.

18 - Valckeniar-Suringar J. — *Eine Ulmenkrankheit in Holland.* Mitt. Dtsch. Dendrol. Ges., *145*, 1922.

19 - Will H. — *Beiträge zur Kenntnis rotgefärbter niederer Pilze.* Centr. f. Bakt., II Abt., **35**, *81*, 1912.

20 - Zahlbruckner A. — *Kryptogamae exsiccatae, editae a Museo Palatino Vindobonensi. Centuria XV-XVI.* Dazu " Schedae „ abgedruckt in den Annales des K. K. naturhistorischen Hofmuseum., **22**, *81* 1927. Riass. in Ctrlbl., f. Bakt, II Abt., **24**, *541*, 1909.

21 - Zimmermann H. — *Verzeichnis der Pilze von Eisgrub. I, II.* Verhand. Naturforsch. Ver. Brun. **52**, *1*, 1913.